

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 2001292772
PUBLICATION DATE : 23-10-01

APPLICATION DATE : 10-04-00
APPLICATION NUMBER : 2000107855

APPLICANT : SHOWA DENKO KK;

INVENTOR : AOKI YASUSHI;

INT.CL. : C12N 15/09 C12N 1/15 C12N 1/19 C12N 1/21 C12N 5/10 C12N 9/80 C12N 9/88
C12P 13/00 C12P 13/02 //(C12N 15/09 , C12R 1:01--), (C12N 9/80 , C12R 1:01
, (C12N 9/88 , C12R 1:01)

TITLE : NITRILE HYDRATASE GENE AND AMIDASE GENE DERIVED FROM BACTERIUM
BELONGING TO THE GENUS RHODOCOCCUS

ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a DNA sequence of a gene coding for nitrile hydratase which is a nitrile-decomposing enzyme derived from bacteria belonging to the genus Rhodococcus and exhibiting especially excellent position selectivity to nitriles and especially to a nitrile group in an aromatic polynitrile compound and a gene coding for amidase and to provide a method for producing an enzyme protein using the DNA sequence and further a method for producing amides and carboxylic acids using the enzyme.

SOLUTION: This nitrile hydratase gene is composed of the DNA sequence coding for a specific amino acid sequence and derived from the bacteria belonging to the genus Rhodococcus and the amidase gene is composed of the DNA sequence coding for a specified amino acid sequence. The method for producing the amides and the carboxylic acids comprises transforming the nitrile group in the nitriles to an amide group and further a carboxy group by using a transformant transformed by a plasmid containing the nitrile hydratase and/or amidase gene DNA.

COPYRIGHT: (C)2001,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-292772

(P2001-292772A)

(43) 公開日 平成13年10月23日 (2001. 10. 23)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームト* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 1/15	4 B 0 2 4
1/15		1/19	4 B 0 5 0
1/19		1/21	4 B 0 6 4
1/21		9/80	A 4 B 0 6 5
5/10		9/88	

審査請求 未請求 請求項の数18 O L (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-107855 (P2000-107855)

(22) 出願日 平成12年4月10日 (2000. 4. 10)

(71) 出願人 000002004

昭和電工株式会社

東京都港区芝大門1丁目13番9号

(72) 発明者 蒲池 晴美

千葉県千葉市緑区大野台1丁目1番1号

昭和電工株式会社総合研究所内

(72) 発明者 青木 裕史

千葉県千葉市緑区大野台1丁目1番1号

昭和電工株式会社総合研究所内

(74) 代理人 100118740

弁理士 柿沼 伸司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子およびアミダーゼ遺伝子

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 ニトリル類、特に芳香族ポリニトリル化合物のニトリル基に対し、特に優れた位置選択性を示すロドコッカス属細菌由来のニトリル分解系酵素であるニトリルヒドラターゼをコードする遺伝子及びアミダーゼをコードする遺伝子のDNA配列、それを用いた該酵素タンパク質の製造法、更には該酵素を用いたアミド類又はカルボン酸類の製造法の提供。

【解決手段】 特定の、アミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子及び特定のアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるアミダーゼ遺伝子。該ニトリルヒドラターゼ及び/又はアミダーゼ遺伝子DNAを含むプラスミドで形質転換された形質転換体を用いてニトリル類のニトリル基をアミド基、更にカルボキシル基に変換するアミド類又はカルボン酸類の製造法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号2または3で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列を含むロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子。

【請求項2】 配列表の配列番号5で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列を含むロドコッカス属細菌由来のアミダーゼ遺伝子。

【請求項3】 ロドコッカス属細菌がロドコッカス エスピー (*Rhodococcus* sp.) ATCC 39484株である請求項1に記載のニトリルヒドラターゼ遺伝子。

【請求項4】 ロドコッカス属細菌がロドコッカス エスピー (*Rhodococcus* sp.) ATCC 39484株である請求項2に記載のアミダーゼ遺伝子。

【請求項5】 請求項1または3に記載の遺伝子DNAを含むプラスミド。

【請求項6】 請求項2または4に記載の遺伝子DNAを含むプラスミド。

【請求項7】 請求項1または3に記載の遺伝子DNAと、請求項2または4に記載の遺伝子DNAの両方を含むプラスミド。

【請求項8】 請求項5に記載のプラスミドで形質転換された形質転換体。

【請求項9】 請求項6に記載のプラスミドで形質転換された形質転換体。

【請求項10】 請求項7に記載のプラスミドで形質転換された形質転換体。

【請求項11】 請求項8または10に記載の形質転換体を培地中で培養し、培養物からニトリルヒドラターゼを採取することを特徴とするニトリルヒドラターゼの製造法。

【請求項12】 請求項9または10に記載の形質転換体を培地中で培養し、培養物からアミダーゼを採取することを特徴とするアミダーゼの製造法。

【請求項13】 請求項8に記載の形質転換体を用いてニトリル類のニトリル基をアミド基に変換することを特徴とするアミド類の製造法。

【請求項14】 請求項9に記載の形質転換体を用いてアミド類のアミド基をカルボキシル基に変換することを特徴とするカルボン酸類の製造法。

【請求項15】 請求項10に記載の形質転換体を用いてニトリル類のニトリル基をカルボキシル基に変換することを特徴とするカルボン酸類の製造法。

【請求項16】 ニトリル類が、オルソフタロニトリル、イソフタロニトリルまたはテレフタロニトリルであり、アミド類が、対応するオルソシアノベンズアミド、メタシアノベンズアミドまたはパラシアノベンズアミドである請求項13に記載のアミド類の製造法。

【請求項17】 アミド類が、オルソシアノベンズアミド、メタシアノベンズアミドまたはパラシアノベンズア

ミド類であり、カルボン酸類が、対応するオルソシアノ安息香酸、メタシアノ安息香酸またはパラシアノ安息香酸である請求項14に記載のカルボン酸類の製造法。

【請求項18】 ニトリル類が、オルソフタロニトリル、イソフタロニトリルまたはテレフタロニトリルであり、カルボン酸類が、対応するオルソシアノ安息香酸、メタシアノ安息香酸またはパラシアノ安息香酸である請求項15に記載のカルボン酸類の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ニトリル類、特に芳香族ポリニトリル化合物のニトリル基に対し、特に優れた位置選択性を示すロドコッカス属細菌由来のニトリル分解系酵素であるニトリルヒドラターゼをコードする遺伝子およびアミダーゼをコードする遺伝子のDNA配列、それを用いた該酵素タンパク質の製造法、さらには該酵素を用いたアミド類またはカルボン酸類の製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】ニトリルヒドラターゼおよびアミダーゼはそれぞれニトリル化合物をアミドに、アミドをカルボン酸に変換する反応を触媒する酵素である。ニトリルヒドラターゼおよびアミダーゼを用いることによってニトリル化合物から、医薬原料等に有用なアミドまたはカルボン酸を得ることができる。ニトリル化合物をそれぞれ相当するアミドまたはカルボン酸に変換する方法が生体触媒の利用によって開発され、このような触媒能をもつ微生物が数多く報告されている（特公昭56-17918号公報、特公昭59-37951号公報、特公昭61-162193号公報、特公昭61-21519号公報、特公昭64-86889号公報、特公平4-197189号公報、特開平2-470公報、EP0444640など）。

【0003】また、これらの微生物からはニトリルヒドラターゼやアミダーゼあるいはニトリラーゼが精製され、さらにはこれらの酵素の遺伝子工学的利用を計るため、その遺伝子が単離され一次構造が決定されている。ニトリルヒドラターゼ遺伝子については、例えばロドコッカス属細菌由来の遺伝子が米国特許番号第2840253号やEP0445646（特開平4-211379号公報）において、シュードモナス属細菌由来の遺伝子が特開平3-251184号公報において、リゾビウム属細菌由来の遺伝子が特開平6-25296号公報や特開平6-303971号公報において、またアミダーゼ遺伝子については、例えばブレバクテリウム属細菌とロドコッカス属細菌由来の遺伝子がEP0433117において開示されている。また、ロドコッカス・エリスロポリス由来の遺伝子がEur. J. Biochem. 217(1), 327-336(1993)において、シュードモナス属細菌由来の遺伝子がFEBS L

et al. 367, 275-279 (1995) において報告されている。

【0004】さらにロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子およびアミダーゼ両遺伝子を含む組換え体プラスミドに関する発明が特開平5-68566号公報において開示されている。

【0005】近年、このような微生物がもつニトリル化合物の変換能を応用する試みがなされている。特に付加価値の高い化合物の製造に利用するために、立体選択性や位置選択性に優れた酵素が望まれている。例えば、特開平2-84198号公報には光学活性な α -置換有機酸の製造に用いる微生物について、特開平4-341185号公報には光学活性な2-ヒドロキシカルボン酸の製造に用いる微生物について、EP0433117には光学活性なケトプロフェンの製造に用いる微生物についてそれぞれ開示されている。

【0006】このような微生物のうち、ロドコッカス エスピー (*Rhodococcus* sp.) ATCC 39484 株は複数のニトリル基を有する芳香族ポリニトリル化合物に対し、優れた位置選択的加水分解能をもつことが報告されている (US556625)。この選択的なニトリル分解酵素系によって生成されるニトリル基とアミド基、ニトリル基とカルボキシル基を分子内に持つ化合物は医薬品製造の合成ブロックとして極めて有効であるが、本菌の持つニトリル変換活性は工業的に利用するためには低く、反応を触媒する酵素の生産性を向上させることが望まれていた。しかし、これらの改良に必要な不可欠な本菌の関連酵素遺伝子はニトリルヒドラターゼ、アミダーゼのいずれについても明らかにされていなかった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的はロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラターゼおよびアミダーゼを、遺伝子工学的手法を用いて効率良く生産したり、タンパク質工学的手法を用いて改良するために必要なロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子、アミダーゼ遺伝子のDNA配列、該遺伝子を含む形質転換体を用いた酵素の製造法、および該形質転換体あるいはそれらによって製造された酵素を用いたアミド類またはカルボン酸類の製造法を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は、下記(1)～(18)の構成を有する。

(1) 配列表の配列番号2または3で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子。

(2) 配列表の配列番号5で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のアミダーゼ遺伝子。

(3) ロドコッカス属細菌がロドコッカス エスピー

(*Rhodococcus* sp.) ATCC 39484 株である(1)に記載のニトリルヒドラターゼ遺伝子。

(4) ロドコッカス属細菌がロドコッカス エスピー (*Rhodococcus* sp.) ATCC 39484 株である(2)に記載のアミダーゼ遺伝子。

(5) (1)または(3)に記載の遺伝子DNAを含むプラスミド。

(6) (2)または(4)に記載の遺伝子DNAを含むプラスミド。

(7) (1)または(3)に記載の遺伝子DNAと、(2)または(4)に記載の遺伝子DNAの両方を含むプラスミド。

【0009】(8) (5)に記載のプラスミドで形質転換された形質転換体。

(9) (6)に記載のプラスミドで形質転換された形質転換体。

(10) (7)に記載のプラスミドで形質転換された形質転換体。

(11) (8)または(10)に記載の形質転換体を培地中で培養し、培養物からニトリルヒドラターゼを採取することを特徴とするニトリルヒドラターゼの製造法。

(12) (9)または(10)に記載の形質転換体を培地中で培養し、培養物からアミダーゼを採取することを特徴とするアミダーゼの製造法。

(13) (8)に記載の形質転換体を用いてニトリル類のニトリル基をアミド基に変換することを特徴とするアミド類の製造法。

【0010】(14) (9)に記載の形質転換体を用いてアミド類のアミド基をカルボキシル基に変換することを特徴とするカルボン酸類の製造法。

(15) (10)に記載の形質転換体を用いてニトリル類のニトリル基をカルボキシル基に変換することを特徴とするカルボン酸類の製造法。

(16) ニトリル類が、オルソフタロニトリル、イソフタロニトリルまたはテレフタロニトリルであり、アミド類が、対応するオルソシアノベンズアミド、メタシアノベンズアミドまたはパラシアノベンズアミドである

(13)に記載のアミド類の製造法。

(17) アミド類が、オルソシアノベンズアミド、メタシアノベンズアミドまたはパラシアノベンズアミド類であり、カルボン酸類が、対応するオルソシアノ安息香酸、メタシアノ安息香酸またはパラシアノ安息香酸である(14)に記載のカルボン酸類の製造法。

(18) ニトリル類が、オルソフタロニトリル、イソフタロニトリルまたはテレフタロニトリルであり、カルボン酸類が、対応するオルソシアノ安息香酸、メタシアノ安息香酸またはパラシアノ安息香酸である請求項15に記載のカルボン酸類の製造法。

【0011】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。
 ロドコッカス エスピー (*Rhodococcus* s
p.) ATCC39484株染色体DNAは、例えばS
 aitoらの方法(Biochem. Biophys.
 Acta. 72, 619(1963))を応
 用して調製することができる。遺伝子のクローニングに
 用いる染色体DNAライブラリーは、例えばpUC18
 などのプラスミドベクターを用いて作成することができ
 る。ニトリルヒドラターゼ遺伝子とアミダーゼ遺伝子の
 クローニングは、例えばSaikiらのPolymer
 ase Chain Reaction (PCR) 法
 (Science 230, 1350(1985))
 を用いて得られた部分断片をプローブとしたコロニーハ
 イブリダイゼーションにより行うことができる。この
 時、使用するPCR用プライマーの一方は、ユニバーサ
 ルプライマー(フォワードまたはリバース)とし、他方
 は目的酵素タンパク質のN末端配列を解析し、それをコ
 ードする配列から、適当な配列を選抜する。これらのプ
 ライマーを組み合わせて、染色体DNAライブラリーを
 鋳型としてアンカーPCRを行うことによって、目的酵
 素のコード配列断片を得ることができる。このアンカー
 PCR法で得たニトリルヒドラターゼコード配列あるい
 はアミダーゼコード配列DNA断片を全遺伝子領域スク
 リーニング用プローブとして使用することにより、ロド
 コッカス エスピー (*Rhodococcus* s
p.) ATCC39484株の染色体DNAライブラ
 リーからニトリルヒドラターゼ遺伝子および/またはアミ
 ダーゼ遺伝子を含む組換え体DNAを得ることができ
 る。ニトリルヒドラターゼコード配列断片およびアミ
 ダーゼコード配列断片のDNA配列は、Sangerらに
 よるdideoxy法(Proc. Natl. Ac
 ad. Sci. U. S. A. 74, 5463
 (1997))など公知の手法を用いて決定することが
 できる。

【0012】得られた酵素構造遺伝子を用いて酵素を生
 産するためには、酵素構造遺伝子を適当な発現ベク
 ター、例えばpUC18のlacプロモーターの下流に接
 続するなどして作成することができる。このようにして
 作成したプラスミドを用いて、例えば大腸菌JM101
 株(*Escherichia coli* JM101)な
 どの宿主を形質転換する。この形質転換体を培養するこ
 とにより、該ニトリルヒドラターゼおよび/またはアミ
 ダーゼが宿主細胞内に着量生産される。この酵素は菌体
 のまま変換反応に使用することもできるが、菌体を破碎
 して無細胞抽出液として、あるいは精製酵素として使用
 することもできる。

【0013】本発明のカルボン酸類またはアミド類の製
 造法は、例えば原料となる化合物と、変換活性を有する
 菌体、無細胞抽出液あるいは酵素を、リン酸緩衝液のこ

とき希薄水溶液に加え、反応液pHを5~10、望まし
 くは6~8に保ち、反応温度を15~45℃、望まし
 くは30~42℃に保つことで行うことができる。反応液
 中に生成した生産物は、反応液の上清を分離回収した
 後、生産物の特性に応じて沈殿形成やカラムクロマトグ
 ラフィーを用いて得ることができる。

【0014】本発明のカルボン酸類またはアミド類の製
 造法の原料に用いられるニトリル類は、1分子中に少な
 くとも1個のニトリル基を有する脂肪族および芳香族の
 化合物である。オルソフタロニトリル、イソフタロニ
 リルおよびテレフタロニトリル等の芳香族ポリニトリル
 化合物が好ましく例示される。

【0015】本発明のカルボン酸類の製造法の原料に用
 いられるアミド類は、アミド基を有する脂肪族および芳
 香族の化合物である。オルソシアノベンズアミド、メタ
 シアノベンズアミドまたはパラシアノベンズアミド等の
 シアノ基を有する芳香族アミド化合物が好ましく例示さ
 れる。

【0016】

【実施例】以下実施例にて本発明を具体的に説明する
 が、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0017】実施例1；染色体DNAの調製

栄養(Lブロス)寒天平板培地で一昼夜培養したR.
sp. ATCC39484株-白金耳を基本培地(KH
₂PO₄ 1.5 g/l、Na₂HPO₄·2H₂O
 0.75 g/l、MgSO₄/7H₂O 0.2 g/
 l、CaSO₄/2H₂O 10 mg/l、FeSO₄
 /7H₂O 5 mg/l、酵母エキス 20 mg/
 l)にグルコース5g/l、尿素2g/lを加えた培地
 300mlで30℃、1日間培養した。培養後の菌体を
 集菌し、5mMのEDTA溶液100mlで菌体を洗浄
 した。この菌体を30mlの緩衝液(20mMトリス・
 塩酸緩衝液(pH7.1))に懸濁し、60mgのリゾ
 チームを加え37℃で2時間インキュベートした。この
 懸濁液を遠心(5000rpm, 7分間)して菌体を回
 収し、11.34mlのTE Bufferに再懸濁
 し、10%SDS0.6mlを加え、さらに100μg
 /mlの濃度となるようにプロテナーゼK(メルク社
 製)を加え、1時間、55℃でゆるやかに振盪した。こ
 の溶液をフェノール抽出、エタノール沈殿することによ
 って染色体DNAを調製した。

【0018】実施例2；染色体ライブラリーの作成

得られた染色体DNA20μgに対し制限酵素Sau3
 AIを用いて部分消化を行った。即ち、染色体DNAを
 4μgづつ5本のチューブにとり、100μlの反応容
 器中で、制限酵素Sau3AI(宝酒造社製、4~12
 U/μl)を添加し37℃で反応させ、10秒毎にチュー
 ブの一本を取り、終濃度20mMとなるようEDTAを
 加え反応を停止させた。このようにして調製した染色体

DNAの部分消化断片溶液をアガロースゲル電気泳動に供し、5～10 kbのDNA断片を沈殿抽出およびエタノール沈殿にて回収し、30 μ lのTE溶液に溶解させた。この試料の9 μ lと1 μ gのBamHI消化後BAP処理したpUC18（宝酒造社製、pUC18/BamHI）とをT4 DNAリガーゼ（宝酒造社製、ライゲーションキット ver. 2）を用いて20 μ lの計でライゲーションした後、大腸菌JM109株を形質転換した。このライブラリーの増幅ライブラリーを作製するために、大腸菌形質転換体をアンピシリン50 ppmを含むLBプロス（pH 7.0）に植菌し、一昼夜培養した菌体からアルカリ-SDS法によりプラスミドを抽出した。

【0019】実施例3：ニトリルヒドラターゼおよびアミダーゼの精製

アンカーPCRに必要な酵素配列に由来する一方のプライマーは、以下のようにして調製した酵素ペプチドのN末端配列から、適当なTmを持つように配列を選択して作成した。

【0020】ニトリルヒドラターゼ活性またはアミダーゼ活性は、それぞれベンゾニトリル10 mMまたはベンズアミド10 mM、リン酸カリウムバッファー（pH 7.0）30 mM、および所定量の菌体抽出液を含む反応混合液1 mlについて、25℃で30分間反応を行わせてから、生成したベンズアミドあるいは安息香酸をHPLCにより検出することにより定性的に行った（HPLC分離条件は後述の実施例8と同様。）。

【0021】*R. s.p.* ATCC39484株を実施例1の基本培地に誘導基質として1 g/lのベンゾニトリルを添加したニトリル分解酵素群誘導培地600 mlに植菌し、30℃で振とう培養した。

【0022】一昼夜培養した培養液を遠心（8000 rpm、15分間）に供して菌体を回収し、得られた菌体湿質量3.2 gを100 mMリン酸カリウムバッファー（pH 7.0、1 mM EDTAおよび2 mM DDTを含む）50 mlで洗浄した後、同バッファー200 mlに懸濁した。これを超音波破碎機に供して菌体を破碎した後、遠心（12,000 rpm、20分間）して上清（粗酵素抽出液）180 mlを得た。

【0023】この無細胞抽出液に45%飽和濃度になるよう硫酸アンモニウムを添加し、4℃で1時間攪拌後、生成した沈殿を遠心分離によって除去した。分離した上清にさらに硫酸アンモニウムを60%飽和濃度になるよう添加し、4℃で1時間攪拌した後、遠心分離により沈殿を回収した。生成した沈殿にはニトリルヒドラターゼ活性およびアミダーゼ活性が確認できた。得られた沈殿を100 mMリン酸カリウムバッファー（pH 7.0、1 mM EDTAおよび2 mM DDTを含む）10 mlに溶解し、同バッファーに対して透析を行なった。

【0024】100 mMリン酸カリウムバッファー（p

H7.0、1 mM EDTAおよび2 mM DDTを含む）で平衡化したDEAE-Sephacelカラム（2 cm×20 cm）に、透析した粗酵素溶液を供し、平衡化バッファーで溶出液のUV 280 nmが低下するまで洗浄した。続いて、0.1 M KClを添加した同バッファーで溶出液のUV 280 nmが低下するまで洗浄し、さらに0.2 MにKCl濃度を上げたバッファーで同様に溶出液のUV 280 nmが低下するまで洗浄した。その後、0.3 MにKCl濃度を上げた100 mMリン酸カリウムバッファー（pH 7.0、1 mM EDTAおよび2 mM DDTを含む。）でニトリルヒドラターゼとアミダーゼを溶出した。活性を示すフラクションを集め、限外濾過膜（分子量30,000 cut）を用いて酵素タンパク質を濃縮した。

【0025】100 mMリン酸カリウムバッファー（pH 7.0、10%飽和濃度の硫酸アンモニウムを含む。）で平衡化したPhenyl Spharose CL7Bカラム（2 cm×40 cm）に、濃縮した活性画分に10%飽和濃度の硫酸アンモニウムを添加したものを供し、酵素を吸着させた。平衡化バッファーで溶出液のUV 280 nmが低下するまで洗浄した。その後、溶出バッファー（100 mMリン酸カリウムバッファー（pH 7.0））でニトリルヒドラターゼおよびアミダーゼを溶出した。活性フラクションを集め、限外濾過膜（分子量30,000 cut）を用いて酵素タンパク質を濃縮した。

【0026】この濃縮したニトリルヒドラターゼ活性画分を100 mMリン酸カリウムバッファー（pH 7.0、0.5 M NaClを含む）で平衡化したSephacryl S-300 スーパーファインカラム（2 cm×60 cm）に供し、同バッファーを用いて分離を行い、溶出液を約0.5 mlずつフラクションした。この段階で、ニトリルヒドラターゼとアミダーゼ活性が最も高いフラクションが分かれたため、それぞれ最も高い活性およびその前後のフラクションをそれぞれ回収した。それぞれ約1.5 mlのフラクションを限外濾過膜（分子量30,000 cut）を用いて濃縮した。

【0027】実施例4：ペプチド末端配列の決定
得られたニトリルヒドラターゼおよびアミダーゼのN末端配列の決定を試みたが、いずれの酵素についてもエドマン分解におけるシグナル強度が低く、配列決定ができなかった。そこで酵素タンパク質を臭化シアン（BrCN）法により加水分解し、生成したペプチドを以下の液体クロマトグラフ条件で分離した。

【0028】

本体；LC 9A（島津製作所）
カラム；Asahipak ODP 50 6D（Shodex）

カラム温度；25℃

溶離液；アセトニトリル0～80%（直線濃度勾配、6

0分間)、0.1%トリフルロ酢酸、流速0.5ml/分

検出: SPD76AV UV VIS Spectrophotometer (島津製作所)、215nm
ニトリルヒドラターゼ活性画分から得られた複数のペプチドのうち、比較的分離の良いサンプルを選択し、再度エドマン分解によるN末端配列分析を行ったところ、既存のニトリルヒドラターゼの配列と相同性の高い以下の配列が確認できた。

Glu (E) · Tyr (Y) · Arg (R) · Ser (S) · Arg (R) · Val (V) · Val (V)
この配列と Rhodococcus 属細菌の Codon Usage を考慮して、ニトリルヒドラターゼ用プライマーを作成した。

5' -GAG TAC CGG TCC CGA-3'
(およびその相補鎖)

*

反応液組成:

R. s.p. ATCC39484 染色体DNAライブラリー	1 μg
ユニバーサルプライマー	100 pmol
酵素ペプチド末端プライマー	100 pmol
dNTP溶液	各1 mM
10x反応バッファー	10 μl
ExTaq DNAポリメラーゼ(宝酒造社製)	2.5 Unit
	計50 μl

反応条件:

熱変性	94℃、45秒
アニーリング	37~60℃、60秒
伸張	72℃、60~90秒
サイクル数	24回

このようにして行った反応のうち、特異的に増幅される断片が見られた反応液を2%アガロースゲル電気泳動に供し、断片を含む部分のゲルを切り出し、ESAYTRAP ver. 2 (宝酒造社製) を用いて精製した。このDNA断片について、dideoxy法によりDNA配列を決定し、翻訳されたアミノ酸配列が既知のニトリルヒドラターゼまたはアミダーゼと相同性があることを確認した。その結果、得られた断片4、14中に、それぞれ既知のニトリルヒドラターゼ、アミダーゼと相同性の高い配列が含まれていることが分かった。断片4には約500bpのニトリルヒドラターゼ相同配列が、断片14には約900bpのアミダーゼ相同配列が含まれており、いずれも次のコロニーハイブリダイゼーションに用いるプローブとして十分な長さであった。

【0031】実施例6;コロニーハイブリダイゼーション

実施例5で得られたニトリルヒドラターゼ遺伝子の一部、およびアミダーゼ遺伝子の一部を含むPCR断片をプローブとして、コロニーハイブリダイゼーション法により全遺伝子のクローニングを行った。実施例2の方法

*同様に、アミダーゼ活性画分から得られた複数のペプチドのうち、比較的分離の良いサンプルを選択し、エドマン分解によるN末端配列分析を行ったところ、既存のアミダーゼの配列と相同性の高い以下の配列が確認できた。

Ala (A) · Val (V) · Gly (G) · Gly (G) · Asp (D) · Gln (Q) · Gly (G)

この配列と Rhodococcus 属細菌の Codon Usage を考慮して、アミダーゼ用プライマーを作成した。

5' -GCA GTC GGC GGC GAC-3'
(およびその相補鎖)

【0029】実施例5;アンカーPCR

PCR法は以下の反応条件でおこなった。

【0030】

に従ってSau3AIで分解した染色体DNAの部分消化断片溶液を1%のアガロースゲル電気泳動に供し、4~8kbのDNA断片を泳動抽出およびエタノール沈殿にて回収し、乾燥後30μlのTE溶液に溶解した。この試料溶液の9μlと、1μlのBamHI消化後BAP処理したpUC18 (宝酒造社製、100ng) とをT4 DNAリガーゼ (宝酒造社製、ライゲーションキット ver. 2) を用いてライゲーションした後、大腸菌JM101株を形質転換し、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 0.1mM、5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド (X-gal) 0.004%、アンピシリン50ppmを含むLBプラスに2%の寒天を加えて平板化した寒天平板培地に塗布して37℃で一昼夜培養した。

【0032】生じた白色コロニーを、アンピシリン50ppmを含むLBプラスに2%の寒天を加えて平板化した寒天平板培地に釣菌し、37℃で一昼夜培養した。十分生育した後、寒天平板培地を約2時間4℃に置き冷却した。乾いたナイロンメンブレン (アマシャム ファルマ

シア バイオテック社製、Hybond-N')に上下左右の印を鉛筆で付けた後冷却した平板培地の上に静かに置き、メンブレンが全体に濡れてくるのを待って静にかつ一気にはがし、平板上のコロニーをメンブレンに移し取った。移し取った菌体が少ない時は、メンブレンをアンピシリン50ppmを含むしブロスに2%の寒天を加えて平板化した寒天平板培地に置き、37℃で一昼夜培養した。

【0033】菌体を移したメンブレンを3mlのアルカリ溶液(NaOH0.5M)上に浮かせ、菌体を溶解した。溶解した菌体の残査を、5×SSCで20分間×2回洗浄して落とした。このメンブレンに対し、Random prime DNA labelling and detection system (アマシャムファルマシア バイオテック社製)を用いてコロニーハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション検出の手順は、同キット添付のマニュアルに従って標準的な条件で行った。約8000コロニーに対して行ったハイブリダイゼーションの結果、各遺伝子について各1株のポジティブクローンが得られた。

【0034】これらのポジティブクローンからアルカリ-SDS法によりプラスミドを抽出し、プローブ用部分断片中にある制限酵素切断サイトの位置と、プラスミドの制限酵素分解パターンとを比較して、挿入断片中の遺伝子の位置と方向を推定した。その結果、ニトリルヒドラターゼのクローン株P11から調整したプラスミドpUNH11は全ニトリルヒドラターゼ遺伝子を含んでいることが分かったが(図1)、アミダーゼのクローン株P12から調製したプラスミドpUAMD12は制限酵素処理パターンが複雑であり、遺伝子の位置方向を特定することができなかった。そこでpUAMD12に関してのみさらに制限酵素処理したフラグメントに対するサザンハイブリダイゼーションを行い、全構造遺伝子領域を含んでいることを推定した(図1)。

【0035】実施例7：欠損変異株の作成と塩基配列の決定

pUNH11およびpUAMD12はそれぞれ3kb?4kbの挿入断片を含むプラスミドであり、そのままでは塩基配列の決定が困難であった。そこでExonuclease IIIを用いて末端から挿入断片を欠損させた欠損変異体(deletion mutant)の作成を試みた。変異体の作成にはkilo?sequence用Deletion Kit(宝酒造社製)を用いた。すなわち、pUNH11またはpUAMD12溶液25マイクロリター(0.4mg/mlとして約16マイクログラム)をSse8387I、XbaIで完全分解(37℃、24時間)し、フェノール抽出で精製後、1/10容量の3M酢酸Naと2.5容量のエタノールを加えて沈殿させた。遠心して沈殿を回収し、70%冷エタノールで一回洗浄した後、真空乾燥沈殿を100マ

イクロリターのExoIII bufferに溶解した。DNA溶液に1マイクロリターのExonuclease IIIを加え、ボルテックスで攪拌後、37℃でインキュベートし、10秒および30秒後に各50マイクロリターをサンプリングした(反応を停止するため、用意してあったMB nuclease buffer各50マイクロリターと混合。)

【0036】この反応液にMB nuclease 2マイクロリターを添加し、37℃で20分間インキュベートした。反応終了後、フェノール抽出して精製し、1/10容量の3M酢酸Naと2.5容量のエタノールを加えて沈殿させた。遠心して回収し、70%冷エタノールで一回洗浄した後真空乾燥させた沈殿を50マイクロリターのklenow bufferに溶解し、klenow fragment 1マイクロリターを加え37℃で15分間インキュベートした。この反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、3つの鎖長域に分画した(ゲルよりそれぞれ切り出し、抽出回収。)

【0037】切り出した断片の回収液10マイクロリターを100マイクロリターのligation solution Aと混合し、ligation solution B 12マイクロリターを加え、ボルテックスで攪拌後16℃で24時間反応させ、セルフライゲーションさせた。このプラスミドで大腸菌JM109株を形質転換した。

【0038】この操作により、pUNH11については20種以上の欠損変異体が取得でき、この中から適当な長さの挿入断片を含む変異体7種を選択し、配列決定に用いることにした。しかし、pUAMD12に関してはもとのプラスミドより大きなプラスミドや用いたベクターより小さなプラスミドが生成するなど、適当な欠損体が取得できないことが判った。そこでpUAMD12に関しては逐次プライマーを合成しながら配列を決定するgene?walking法による配列決定を行うことにした。

【0039】塩基配列の決定はdideoxy法により、pUNH11は挿入断片の全域に相当する約2.8kbのDNA配列、pUAMD12は挿入断片の約2/3に相当する約2.8kbのDNA配列を決定した。プローブとして用いた部分断片配列と一致する部分を探索したところ、pUNH11、pUAMD12それぞれの挿入断片のEcoRIサイト側から約0.2kb、1.1kb下流から、ニトリルヒドラターゼ遺伝子はlacプロモーターに対して逆順に、アミダーゼ遺伝子は正の方向に存在していることが分かった。この方向と位置は、pUNH11に関しては制限酵素の切断断片生成パターンから推定した遺伝子の位置と方向に、pUAMD12に関しては制限酵素の切断パターンとサザンハイブリダイゼーションの結果から推定されたものと一致していた。これらの遺伝子配列から翻訳されたアミノ酸配列

は、既知のいずれのニトリルヒドラターゼ、アミダーゼの
のアミノ酸配列とも異なる新規なものであった。

【0040】実施例8；ニトリルヒドラターゼおよびアミ
ミダーゼ活性の測定

ニトリルヒドラターゼ活性は20mMリン酸緩衝液（pH7.0）10mlにテレフタルニトリル（TPN）を
基質として1～10質量%を懸濁した反応液に、菌体
（湿質量で1g前後）を加えて30℃で振とうしながら
反応を行い、一定時間毎に反応液中に生成したパラシア＊

装置：ポンプ；DS-2（Shodex）

検出器；SPD-6AV UV-VIS spectrophotometer（Shimadzu）

サンプル導入；Autosampler Model23（SIC）with 20 ul sample tube

記録；Chromatocoder 12（SIC）

カラム；ODSpak F-411（Shodex），4.6×150mm，40℃

分離条件；AcCN/H₂O=50:50，0.1%TFA，1ml/min.

活性は乾燥質量1gの菌体が1時間に1lの反応液中に
生成するパラシアノ安息香酸アミド、パラシアノ安息香
酸または安息香酸のg質量（g/l/h r/g乾燥菌体）
で表すことにした。

【0042】実施例9；高発現株の作成

実施例6で得たポジティブクローンP11またはP12
株をアンピシリン50ppmを含むLBプロスで培養する
と、イソプロピル-B-D-チオガラクトピラノシド
（IPTG）の存在の如何に関わらず弱いニトリルヒ
ドラターゼ活性が確認できた。しかしこの活性はドナーで
あるロドコッカス属細菌の数十分の一という低いもので
あった。他方のP12株にはアミダーゼ活性はまったく
認められなかった。

【0043】そこで酵素生産量を増やすため、それぞれの
酵素構造遺伝子部分のみの断片をPCRで作成し、p
UC18のlacプロモーター直後につないだプラスミ
ドpUNHE1およびpUAMDE1を作成した。さら
にこの両断片を同じプラスミド上に乗せたプラスミドp
UNHAMDE1を作成した。

【0044】PCR断片作成に用いたプライマーおよび
反応条件は以下の通り。

反応液組成：

プラスミドDNA	0.8～1μg
プライマー	各100pmol
dNTP溶液	各1mM
10x反応バッファー	10μl
ExTaq DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）	2.5U
	計50μl

反応条件：

熱変性	94℃、60秒
アニーリング	55℃、60秒
伸長	72℃、120秒
サイクル数	24回

ニトリルヒドラターゼ遺伝子、アミダーゼ遺伝子共に、
生成した断片をアガロースゲル電気泳動し、抽出・回収

＊ノ安息香酸アミドをHPLCで定量することによって測
定した。通常、反応液から固形物を遠心分離して除去し
た後、上清を溶離液で100倍希釈したものをHPLC
サンプルとして用いた。アミダーゼ活性は基質としてパ
ラシアノベンズアミドまたはベンズアミドを用い、同じ
条件で反応させ、生成したパラシアノ安息香酸または安
息香酸をHPLCで定量することによって測定した。

【0041】各生成物の定量は、以下の装置・条件で行
った。

※ pUNHE1

（フォワード）

5'-acc atg gat ggt atc cac
gac-3'

20 （βサブユニット開始コドン）（NcoIサイト）
（リバーズ）

5'-cc aag ctt tca tac gat
cac ttc-3'

（αサブユニット終止コドン）（HindIIIサイト）

pUAMDE1

（フォワード）

5'-acc atg gct tcg ttg act
cc-3'

30 （NcoIサイト、アミノ酸3番目Ser→Alaに変
異）

（リバーズ）

5'-cc aag ctt tca gga cgg
cac cga-3'

（HindIIIサイト）

した後、断片を制限酵素NcoIとHindIIIで切
断し、EcoRINcoIリンカーとライゲーション

後、EcoRI?HindIIIカットしたpUC18とライゲーションした(図2)。

【0045】ニトリルヒドラターゼ遺伝子とアミダーゼ遺伝子を同じプラスミド上に乗せたプラスミドは、まずニトリルヒドラターゼ断片を制限酵素NcoIとHindIIIで切断し、EcoRI-NcoIリンカー、HindIII-NcoIリンカーの順でライゲーション後、NcoIとHindIIIで切断したアミダーゼ断片とライゲーションし、最後にEcoRI?HindIIIカットしたpUC18とこの断片をライゲーションした(図3)。

【0046】これらのプラスミドで大腸菌JM109株*

*を形質転換し、得られた形質転換体をアンピシリン50 ppmを含むLBプロスで一昼夜培養した後、イソプロピルーB-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を0.1 mMになるよう培養液に加えてさらに2時間培養した。得られた形質転換体のニトリル変換活性を実施例8に示した方法により測定したところ、いずれのプラスミドで形質転換した形質転換体も、ドナーであるロドコッカス属細菌より高い活性が確認できた。両方の遺伝子を乗せたプラスミドで形質転換したもののみは、ドナーと同等の活性を示した。

【0047】

【表1】

株	非誘導時の活性	誘導時の活性
R. s p. ATCC39484	-	0.17 ¹⁾
pUNH11形質転換体	0.009	0.007
pUAMD12形質転換体	nd	nd
pUNHE1形質転換体	0.35	0.41
pUAMDE1形質転換体	0.11	0.27
pUNHAMDE1形質転換体	0.11 ²⁾	0.13 ²⁾

【0048】活性単位：g/l/hr/g乾燥菌体

¹⁾ ドナーの活性はアミドの生成速度のみ(酸の生成速度はニトリラーゼの影響のため正確に測定不能)

²⁾ pUNHAMDE1はニトリルー酸生成速度を測定

【0049】

【発明の効果】本発明は複数のニトリル基を有する芳香族ポリニトリル化合物に対し、優れた位置選択的加水分解能をもつロドコッカス属細菌のニトリルヒドラターゼおよびアミダーゼ遺伝子を提供するものである。これらのDNA配列は、ニトリルヒドラターゼ、アミダーゼの遺伝子工学的手法を用いた効率的生産やタンパク質工学※

※的手法を用いた酵素の改良などに不可欠なものであり、

20 このようにして得た酵素は有用化合物の工業的生産への応用に期待できる。

【0050】

【図面の簡単な説明】

【図1】 クローン株から調製したプラスミドの構造。

【図2】 発現用プラスミドの構築(1)。

【図3】 発現用プラスミドの構築(2)。

【0051】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> SHOWA DENKO K.K.

<120> Rhodococcus sp. ATCC39484 genes for nitrile hydratase and amidase.

<130> 11H120068

<140>

<141>

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2822

<212> DNA

<213> Rhodococcus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1379)..(2068)

<223> nitrile hydratase beta subunit

<220>

<221> CDS

<222> (2082)..(2693)

<223> nitrile hydratase alfa subunit

<400> 1

17

18

ctgagggatc tcggtcatc cgtaccatc gttcggacg atggtgtca atacgtacca 60
 ctgggtccgc gtaacclct cltgatcac cagttatg atctacac leagggaccg 120
 gtcacgqct tccagggcgc ctccgacca aggtgatca acgacattt cggattcacg 180
 caccgcttc gactcgatca ttcctgtccc tcccgtcca cgcgcagttg atcttacctc 240
 ctcatcaaga ggtatccac tgaacqaatt atttcaagt qaaqtactt ggtcgtacc 300
 tacacgtgag tggacgatgc ctgggcgcta gtcggatgtg caaccaccc accccctct 360
 cccgctacg ccgaagacc gaaccgqct cgtccctgcc tcccgtctct ggaactgtt 420
 gtgaacgccc gaggggcct caggtctct cagttggcg ggtcggcat ggcggacgtc 480
 qccacgqcg gacactacg atcttcguc ggaagcgac cgcggtcac aacacctacg 540
 qcgatcgaq cacctgagc gaagggccc ggcgtctct cccggaatc cgaqcccaq 600

 ccgtgacac caacgtcgt ggcgttccc tcccctcta ggtctttga ctccgqcca 660
 acgcttcga gggcgtcgt cgcggaccac ttgtcgagt cgtgcccga cgtcaccgaq 720
 cgcaccttc ttctgtctct gcgcatcgc ccggaccgc accgcggca cactacgacg 780
 tctgacaatg ctgatccct gccgcgcgc ttggacgacc acagttgcta cgaqcatgcg 840
 gagccaacca taqcatcat gcgacgccc ggtcttcat cctattttg gatgcgcaq 900
 attaacacat ctacacattg acatccgtt cgtgtgaag taaaaattg cagtagggc 960
 ggcagcgaa gtctgcagc cgaacatca aggttggag ccgagagatc ggaqacgcaq 1020
 acaccggag ggaacttagc ctcccggacc gatgcgtgtc ctggcaacgc ctcaagattc 1080
 agcgcaaqc attcaattt gttacttcca gaaccgaatc agtccccgt agtgcgqg 1140
 gagagcggc gaacgcaggg atggtatcca tgcggccctt ctcttttga acgaqaaccg 1200
 gccggtacag tcaatccga cacattgtg cgcgttcaa cgattgtgt gctgtgaagg 1260
 attactcaa gccactgat atcgcatc cgttgcgga acatttgacg cttctccct 1320
 acgagtagaa gccagctgga cctctttga gccagctcc gatgaaagg atgaggaa 1378
 atg gat ggt atc cac gac aca ggc ggc atg acc gga tac gga ccg gtc 1426
 Met Asp Gly Ile His Asp Thr Gly Gly Met Thr Gly Tyr Gly Pro Val
 1 5 10 15
 ccc tat cag aag gac gag ccc ttc ttc cac tac gag tgg gag ggt cga 1474
 Pro Tyr Gln Lys Asp Glu Pro Phe Phe His Tyr Glu Trp Glu Gly Arg
 20 25 30

 acc ctg tcg att ctg acc tgg atg cat ctc aag ggc atg tcg tgg tgg 1522
 Thr Leu Ser Ile Leu Thr Trp Met His Leu Lys Gly Met Ser Trp Trp
 35 40 45
 gac aag tcg cgg ttc ttc cgg gag tcg atg ggg aac gaa aac tac gtc 1570
 Asp Lys Ser Arg Phe Phe Arg Glu Ser Met Gly Asn Glu Asn Tyr Val
 50 55 60
 aac gag att cgc aac tcg tac tac acc cac tgg ctg agt gcg gcg gaa 1618
 Asn Glu Ile Arg Asn Ser Tyr Tyr Thr His Trp Leu Ser Ala Ala Glu
 65 70 75 80
 cgt atc ctc gtc gcc gac aag atc atc acc gaa gaa gag cga aag cac 1666
 Arg Ile Leu Val Ala Asp Lys Ile Ile Thr Glu Glu Glu Arg Lys His
 85 90 95
 cgc gtg cag gag atc ctc gag ggt cgg tac acg gac agg aac ccg tcg 1714
 Arg Val Gln Glu Ile Leu Glu Gly Arg Tyr Thr Asp Arg Asn Pro Ser
 100 105 110
 cgg aag ttc gat ccg gcc gag atc gag aag gcg atc gag agg ctt cac 1762
 Arg Lys Phe Asp Pro Ala Glu Ile Glu Lys Ala Ile Glu Arg Leu His
 115 120 125

19	20
qag ccc cac tcc cta gtg ctt cca qga qag qag ccg aqt ttc tcc ctc Glu Pro His Ser Leu Val Leu Pro Gly Ala Glu Pro Ser Phe Ser Leu 130 135 140	1810
qgt gac aag gtc aaa gtg aag aac atg aac ccg ctg qga cac aca ccg Gly Asp Lys Val Lys Val Lys Asn Met Asn Pro Leu Gly His Thr Arg 145 150 155 160	1858
tgc ccg aag tat gtg ccg aac aqa atc qag qaa atc gtc acc tcc cac Cys Pro Lys Tyr Val Arg Asn Arg Ile Gly Glu Ile Val Thr Ser His 165 170 175	1906
qgg tgc caq atc tat ccc qag aqc aqc tcc gcc qgc ctc qgc qac gat Gly Cys Gln Ile Tyr Pro Glu Ser Ser Ser Ala Gly Leu Gly Asp Asp 180 185 190	1954
ccc cgc ccg ctc tac acg gtc gcg ttt tcc gcc cag qaa ctg tgg gcc Pro Arg Pro Leu Tyr Thr Val Ala Phe Ser Ala Gln Glu Leu Trp Gly 195 200 205	2002
qac gac qga aac ggg aaa qac qta gtg tgc gtc gat ctc tgg qaa ccg Asp Asp Gly Asn Gly Lys Asp Val Val Cys Val Asp Leu Trp Glu Pro 210 215 220	2050
tac ctg atc tct gcg tga aaqgaatacg ata gtg aqc gag cac gtc aat Tyr Leu Ile Ser Ala Val Ser Glu His Val Asn 225 230 5	2099
aag tac acg gag tac gag gca cgt acc aag gca atc qaa acc ttg ctg Lys Tyr Thr Glu Tyr Glu Ala Arg Thr Lys Ala Ile Glu Thr Leu Leu 10 15 20	2147
tac gag cga ggg ctc atc acg ccc gcc gcg gtc gac cga gtc gtt tcg Tyr Glu Arg Gly Leu Ile Thr Pro Ala Ala Val Asp Arg Val Val Ser 25 30 35	2195
tac tac gag aac gag atc gcc ccg atg gcc ggt gcc aag gtc gtg gcc Tyr Tyr Glu Asn Glu Ile Gly Pro Met Gly Gly Ala Lys Val Val Ala 40 45 50	2243
aag tcc tgg gtg gac cct gag tac cgc aag tgg ctc qaa qaa gac gcg Lys Ser Trp Val Asp Pro Glu Tyr Arg Lys Trp Leu Glu Glu Asp Ala 55 60 65 70	2291
acg gcc gcg atg gcg tca ttg gcc tat gcc gcc gag cag qca cac cag Thr Ala Ala Met Ala Ser Leu Gly Tyr Ala Gly Glu Gln Ala His Gln 75 80 85	2339
atc tcg gcc gtc ttc aac gac tcc caa aca cat cac qta gtg gtg tgc Ile Ser Ala Val Phe Asn Asp Ser Gln Thr His His Val Val Val Cys 90 95 100	2387
act ctg tgt tcg tgc tat ccg tgg ccg gtg ctt gcc ctc ccg ccc gcc Thr Leu Cys Ser Cys Tyr Pro Trp Pro Val Leu Gly Leu Pro Pro Ala 105 110 115	2435
tgg tac aag aqc atg gag tac ccg tcc cga gtg gta qca gac cct cgt Trp Tyr Lys Ser Met Glu Tyr Arg Ser Arg Val Val Ala Asp Pro Arg 120 125 130	2483
qga gta ctc aag cgc gat ttc ggg ttc gac atc ccc gat gag gtg gag Gly Val Leu Lys Arg Asp Phe Gly Phe Asp Ile Pro Asp Glu Val Glu 135 140 145 150	2531

21 22
 atc aag qtt tgg gac agc aac tcc gaa atc cgc tac atc qtc atc ccg 2579
 Val Arg Val Trp Asp Ser Ser Ser Glu Ile Arg Tyr Ile Val Ile Pro
 155 160 165
 gaa cgg ccg gcc ggc acc gac ggt tgg tcc gag gac gag ctg gcg aag 2627
 Glu Arg Pro Ala Gly Thr Asp Gly Trp Ser Glu Asp Glu Leu Ala Lys
 170 175 180
 ctg gtg aqt cgg gac tcg atg atc ggt qtc aqt aat gcg ctc aca ccg 2675
 Leu Val Ser Arg Asp Ser Met Ile Gly Val Ser Asn Ala Leu Thr Pro
 185 190 195
 cag gaa qtg atc gta tga qtgaagacac actcactgat cggctcccgg 2723
 Gln Glu Val Ile Val
 200

cgaactgggac cggcgcaccg ccccgcgaca atggcgagct tqtattcacc gaccccttggg 2783
 aagcaacggc attcggggtc gccatcgccg tttcggatc 2822

<210> 2

<211> 229

<212> PRT

<213> Rhodococcus sp.

<400> 2

Met Asp Gly Ile His Asp Thr Gly Gly Met Thr Gly Tyr Gly Pro Val
 1 5 10 15
 Pro Tyr Gln Lys Asp Glu Pro Phe Phe His Tyr Glu Trp Glu Gly Arg
 20 25 30
 Thr Leu Ser Ile Leu Thr Trp Met His Leu Lys Gly Met Ser Trp Trp
 35 40 45
 Asp Lys Ser Arg Phe Phe Arg Glu Ser Met Gly Asn Glu Asn Tyr Val
 50 55 60
 Asn Glu Ile Arg Asn Ser Tyr Tyr Thr His Trp Leu Ser Ala Ala Glu
 65 70 75 80
 Arg Ile Leu Val Ala Asp Lys Ile Ile Thr Glu Glu Glu Arg Lys His
 85 90 95
 Arg Val Gln Glu Ile Leu Glu Gly Arg Tyr Thr Asp Arg Asn Pro Ser
 100 105 110
 Arg Lys Phe Asp Pro Ala Glu Ile Glu Lys Ala Ile Glu Arg Leu His
 115 120 125
 Glu Pro His Ser Leu Val Leu Pro Gly Ala Glu Pro Ser Phe Ser Leu
 130 135 140
 Gly Asp Lys Val Lys Val Lys Asn Met Asn Pro Leu Gly His Thr Arg
 145 150 155 160
 Cys Pro Lys Tyr Val Arg Asn Arg Ile Gly Glu Ile Val Thr Ser His
 165 170 175
 Gly Cys Gln Ile Tyr Pro Glu Ser Ser Ser Ala Gly Leu Gly Asp Asp
 180 185 190
 Pro Arg Pro Leu Tyr Thr Val Ala Phe Ser Ala Gln Glu Leu Trp Gly
 195 200 205
 Asp Asp Gly Asn Gly Lys Asp Val Val Cys Val Asp Leu Trp Glu Pro
 210 215 220
 Tyr Leu Ile Ser Ala

23

24

225

<210> 3

<211> 203

<212> PRT

<213> Rhodococcus sp.

<400> 3

Val Ser Glu His Val Asn Lys Tyr Thr Glu Tyr Glu Ala Arg Thr
 1 5 10 15
 Lys Ala Ile Glu Thr Leu Leu Tyr Glu Arg Gly Leu Ile Thr Pro Ala
 20 25 30
 Ala Val Asp Arg Val Val Ser Tyr Tyr Glu Asn Glu Ile Gly Pro Met
 35 40 45
 Gly Gly Ala Lys Val Val Ala Lys Ser Trp Val Asp Pro Glu Tyr Arg
 50 55 60
 Lys Trp Leu Glu Glu Asp Ala Thr Ala Ala Met Ala Ser Leu Gly Tyr
 65 70 75
 Ala Gly Glu Gln Ala His Gln Ile Ser Ala Val Phe Asn Asp Ser Gln
 80 85 90 95
 Thr His His Val Val Cys Thr Leu Cys Ser Cys Tyr Pro Trp Pro
 100 105 110
 Val Leu Gly Leu Pro Pro Ala Trp Tyr Lys Ser Met Glu Tyr Arg Ser
 115 120 125
 Arg Val Val Ala Asp Pro Arg Gly Val Leu Lys Arg Asp Phe Gly Phe
 130 135 140
 Asp Ile Pro Asp Glu Val Glu Val Arg Val Trp Asp Ser Ser Ser Glu
 145 150 155
 Ile Arg Tyr Ile Val Ile Pro Glu Arg Pro Ala Gly Thr Asp Gly Trp
 160 165 170 175
 Ser Glu Asp Glu Leu Ala Lys Leu Val Ser Arg Asp Ser Met Ile Gly
 180 185 190
 Val Ser Asn Ala Leu Thr Pro Gln Glu Val Ile Val
 195 200

<210> 4

<211> 2822

<212> DNA

<213> Rhodococcus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1094)..(2491)

<223> amidase

<400> 4

tgattacgaa ttcgagctcg gtacccgggg atcacttcgg ccagaggggtg acggcgaat 60
 cgggcctcga tctccgcgtc cacggcgttg atactgtgtt cgaagtcgat caccgcctgc 120
 gccaatccgg cgaccagttc ggcagcgaca tcttcccccg gcaaccgcac ggtctgcgcc 180

 ttcgcggcgg tgactgcggc ccgggcgacg gattcggcgt ggcgcacccc ggcgccggtg 240
 agcattgcgg ccagtcgggc cggcccgacg cggcggatcg ctttcggtcg ctggtagcgg 300
 gccagcagca ccaccagcc ccggtccgag gagatctgcg cgacgcgttc ggtccgggg 360
 cagatcgca cgagttgctg acgcagccgg ttgatggtcc ggtacggtc ggcgaccaga 420

25

26

tcggtgcggt gcccggtgag catctgcagc tccgqatca actcgtcgtc gggacgcga 480
 acgggcaggt ccgaccgcat ccggactga tcggcgatca cccgggcgtc gcgggcgtc 540
 gtcttggctt cggcgcgcg qtagaccgac gatgcctgcc acaccgaacg tncggacag 600
 tagcgaccg gtttcccgcc gtcggccagc acagtcagca acaaggtgac gtaggcggtg 660
 qtcagatcca ccgtccacga caccgtctcg gtgagtcggt ccatctcgtt gacaccgca 720
 cggatcgttg ctctcgtctt gtcacatgc cgcgacagca ccaccgtccc ggaagtgctc 780
 agtacgcata tccagtggtg ttctttgccg acgtcgactc ctgccacag ttccgaaccg 840
 gtcacgcgat ttctcgttt tcgcttggtt tccggcctgg ccccgatgga cgcctncgcc 900
 ggcatttctt taacaagcg atcatgcgca gatctcaatc agcggtccag aqgtgtccag 960
 acaggtcggg tqccagtc tttcaagccc cactcgagag tgggcaaac ttatgcagcc 1020

tcggcgccct gcccgggtta cagctcaacg taactctcac gaagtaactg cacctacgaa 1080
 cttaggaac ctc atg tct tcg ttg act ccc ccc aat tcc aac caa atg 1129

Met Ser Ser Leu Thr Pro Pro Asn Ser Asn Gln Met

1 5 10

tcg gcc ctg aac aac cac ttc cga ttc gga ctg acg acg ccg gaa ctc 1177
 Ser Ala Leu Asn Asn His Phe Arg Phe Gly Leu Thr Thr Pro Glu Leu

15 20 25

gaa gag ttc gca ccg gcc ctc gaa gcg acg ctc gcg tcc tcc gaa acc 1225
 Glu Glu Phe Ala Pro Ala Leu Glu Ala Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr

30 35 40

gtc gaa cgc ctc tac gag cgc acc gcg ccc gag ccg cct cag ccg tca 1273
 Val Glu Arg Leu Tyr Glu Arg Thr Ala Pro Glu Pro Pro Gln Arg Ser

45 50 55 60

tgg acc tca ccc acg gcg gac gag aac ccg ctg agc gcc tgg tac gtc 1321
 Trp Thr Ser Pro Thr Ala Asp Glu Asn Pro Leu Ser Ala Trp Tyr Val

65 70 75

acc acc tcg atc agc gaa acc gac gaa ggc ccc ctc gcc ggg cga acg 1369
 Thr Thr Ser Ile Ser Glu Thr Asp Glu Gly Pro Leu Ala Gly Arg Thr

80 85 90

gtc gcc gtg aaa gac aac gtc gca gtc gcc ggc gtg ccg atg atg aac 1417
 Val Ala Val Lys Asp Asn Val Ala Val Ala Gly Val Pro Met Met Asn

95 100 105

ggc tcc cga acc gtc gag ggc ttc acc ccc cgc tac gac gcc acc gtc 1465
 Gly Ser Arg Thr Val Glu Gly Phe Thr Pro Arg Tyr Asp Ala Thr Val

110 115 120

gta cgc cga ctg ctc gac gcc ggc gca acc atc acc ggc aaa gcg gtg 1513
 Val Arg Arg Leu Leu Asp Ala Gly Ala Thr Ile Thr Gly Lys Ala Val

125 130 135 140

tgc gaa gat ctc tgc ttc tcc ggc gcc agc ttc act tcc cac ccc cag 1561
 Cys Glu Asp Leu Cys Phe Ser Gly Ala Ser Phe Thr Ser His Pro Gln

145 150 155

ccg gtc cgc aac ccc tgg gac gaa agc cgc atc acc ggc ggc tcg tcc 1609
 Pro Val Arg Asn Pro Trp Asp Glu Ser Arg Ile Thr Gly Gly Ser Ser

160 165 170

agc ggc agc ggc gcc ctg gtc gcc agc ggc cag gtg gat atg gca gtc 1657
 Ser Gly Ser Gly Ala Leu Val Ala Ser Gly Gln Val Asp Met Ala Val

175 180 185

ggc ggc gac cag ggc ggt tcg atc cgc atc ccc gcc gcg ttc tgc ggc 1705
 Gly Gly Asp Gln Gly Gly Ser Ile Arg Ile Pro Ala Ala Phe Cys Gly

27		28
190	195	200
atc gtc qga cac aaa ccc acc cac gga ctg gtc ccc tat acg qga qca		1753
Ile Val Gly His Lys Pro Thr His Gly Leu Val Pro Tyr Thr Gly Ala		
205	210	215
		220
ttt ccc atc gaa cga acc atc qac cac ctc ggt ccg atg acg cgc acg		1801
Phe Pro Ile Glu Arg Thr Ile Asp His Leu Gly Pro Met Thr Arg Thr		
225	230	235
gtc agc qac qcc gcc qca atg ctc acc gtc ctc qcc qgc acc qac qgc		1849
Val Ser Asp Ala Ala Ala Met Leu Thr Val Leu Ala Gly Thr Asp Gly		
240	245	250
ctc gat ccc cga cag acc cac ccg atc qaa ccg gtg qac tac ctc qcg		1897
Leu Asp Pro Arg Gln Thr His Arg Ile Glu Pro Val Asp Tyr Leu Ala		
255	260	265
qcg ctg gcc gaa ccc qca tcg ggt ctg cgc gtg ggt gtg gtc acc qaa		1945
Ala Leu Ala Glu Pro Ala Ser Gly Leu Arg Val Gly Val Val Thr Glu		
270	275	280
ggc ttc qac acc cct gtc tcc qac gct gcc gtc qac aat gcc gtg cgc		1993
Gly Phe Asp Thr Pro Val Ser Asp Ala Ala Val Asp Asn Ala Val Arg		
285	290	295
acc gcc atc qgc gta ctg cgc tcg gcc gga ctt acc gtc gaa qag gtc		2041
Thr Ala Ile Gly Val Leu Arg Ser Ala Gly Leu Thr Val Glu Glu Val		
305	310	315
tcg atc ccc tgg cac ctc gat gcg atg gcc gtc tgg aac gtg atc qac		2089
Ser Ile Pro Trp His Leu Asp Ala Met Ala Val Trp Asn Val Ile Asp		
320	325	330
cgg gcc qac qac gaa ttc qaa gcc ttc ctg ctg cag gtg ctc qac qag		2137
Arg Ala Asp Asp Glu Phe Glu Ala Phe Leu Leu Gln Val Leu Asp Glu		
335	340	345
aac gcc gtc acc atc ccc gaa ctc gga cag gtg cgg gcg cag acg ccg		2185
Asn Ala Val Thr Ile Pro Glu Leu Gly Gln Val Arg Ala Gln Thr Pro		
350	355	360
cgc tcg tgg tgc tca cct cga acc gca ccc gcg agg tgc acg acg ccc		2233
Arg Ser Trp Cys Ser Pro Arg Thr Ala Pro Ala Arg Cys Thr Thr Pro		
365	370	375
tca aac gcc gct gcc tgt acc act ggc tcg aac acc ccg acc tcg cgc		2281
Ser Asn Ala Ala Ala Cys Thr Thr Gly Ser Asn Thr Pro Thr Ser Arg		
385	390	395
ggg aag tgg aga tcc tgc gcc gcc gca tcc cgg gca tcg acg aac acc		2329
Gly Lys Trp Arg Ser Cys Ala Ala Ala Ser Arg Ala Ser Thr Asn Thr		
400	405	410
tcg cgg cgc agg tcg ccc acg ccg tgc agg cca tgc gcg gga tgg acc		2377
Ser Arg Arg Arg Ser Pro Thr Pro Cys Arg Pro Cys Ala Gly Trp Thr		
415	420	425
tgc tca aac cac ccg ggg tcg cgg agt cgc tgg act ggg cac qag cgc		2425
Cys Ser Asn His Pro Gly Ser Arg Ser Arg Trp Thr Gly His Glu Arg		
430	435	440
tgc ggg aac tcg acc gcg acg tgc tcg acg cga cga ccg cgg ccg cga		2473
Cys Gly Asn Ser Thr Ala Thr Cys Ser Thr Arg Arg Pro Arg Pro Arg		
445	450	455
		460

29

30

ccc tcg qtg ccg tcc tga agtaccggga ggaacctgac cgaqtggtc

2521

Pro Ser Val Pro Ser

465

gcaccgggct cgaccggctc ctgacggggt gacagcggcg atgacgacga ccaccgacgc 2581

cgggggttcc ctctcgac tcaccggctt caccgcgcc ctgcccgcg ccgacctgctc 2641

cgtcgctcg gacgccaccg tggctacct gcgcgcctg cgcgagatcg acctcgccga 2701

ccgccgtcag gtgtactggg ccgggcgcgc caccctgtgc cagcaccgcg acgacatccc 2761

ccgctacgac ctgcggttcg agagctggtt cggcggaacg gcaccgcgac tgacgtcgcc 2821

q

2822

<210> 5

<211> 465

<212> PRT

<213> Rhodococcus sp.

<400> 5

Met Ser Ser Leu Thr Pro Pro Asn Ser Asn Gln Met Ser Ala Leu Asn

1

5

10

15

Asn His Phe Arg Phe Gly Leu Thr Thr Pro Glu Leu Glu Glu Phe Ala

20

25

30

Pro Ala Leu Glu Ala Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr Val Glu Arg Leu

35

40

45

Tyr Glu Arg Thr Ala Pro Glu Pro Pro Gln Arg Ser Trp Thr Ser Pro

50

55

60

Thr Ala Asp Glu Asn Pro Leu Ser Ala Trp Tyr Val Thr Thr Ser Ile

65

70

75

80

Ser Glu Thr Asp Glu Gly Pro Leu Ala Gly Arg Thr Val Ala Val Lys

85

90

95

Asp Asn Val Ala Val Ala Gly Val Pro Met Met Asn Gly Ser Arg Thr

100

105

110

Val Glu Gly Phe Thr Pro Arg Tyr Asp Ala Thr Val Val Arg Arg Leu

115

120

125

Leu Asp Ala Gly Ala Thr Ile Thr Gly Lys Ala Val Cys Glu Asp Leu

130

135

140

Cys Phe Ser Gly Ala Ser Phe Thr Ser His Pro Gln Pro Val Arg Asn

145

150

155

160

Pro Trp Asp Glu Ser Arg Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ser Gly Ser Gly

165

170

175

Ala Leu Val Ala Ser Gly Gln Val Asp Met Ala Val Gly Gly Asp Gln

180

185

190

Gly Gly Ser Ile Arg Ile Pro Ala Ala Phe Cys Gly Ile Val Gly His

195

200

205

Lys Pro Thr His Gly Leu Val Pro Tyr Thr Gly Ala Phe Pro Ile Glu

210

215

220

Arg Thr Ile Asp His Leu Gly Pro Met Thr Arg Thr Val Ser Asp Ala

225

230

235

240

Ala Ala Met Leu Thr Val Leu Ala Gly Thr Asp Gly Leu Asp Pro Arg

245

250

255

Gln Thr His Arg Ile Glu Pro Val Asp Tyr Leu Ala Ala Leu Ala Glu

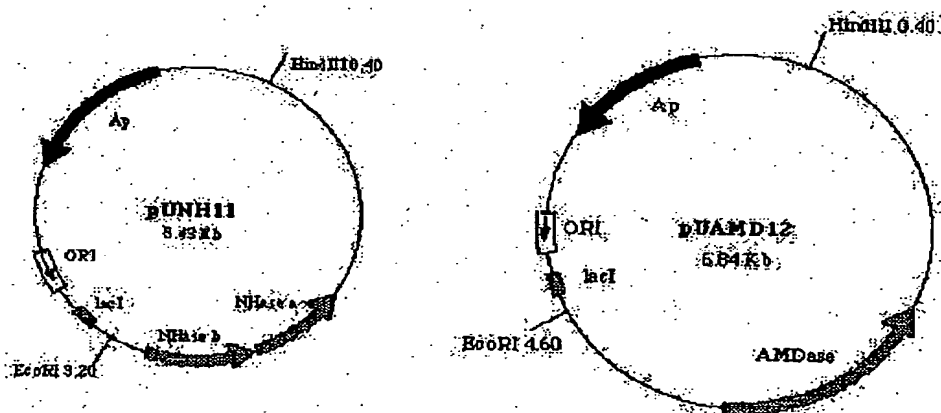
260

265

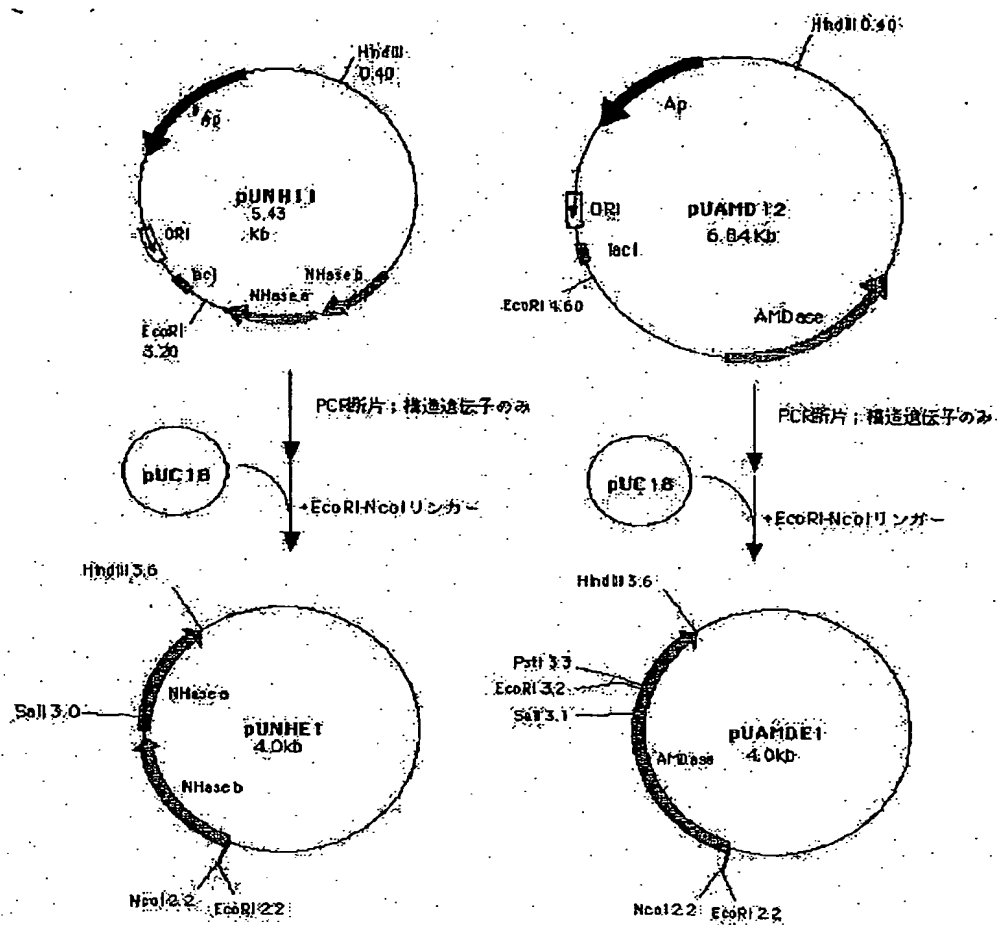
270

31
 Pro Ala Ser Gly Leu Arg Val Gly Val Val Thr Glu Gly Phe Asp Thr
 275 280 285
 Pro Val Ser Asp Ala Ala Val Asp Asn Ala Val Arg Thr Ala Ile Gly
 290 295 300
 Val Leu Arg Ser Ala Gly Leu Thr Val Glu Glu Val Ser Ile Pro Trp
 305 310 315 320
 His Leu Asp Ala Met Ala Val Trp Asn Val Ile Asp Arg Ala Asp Asp
 325 330 335
 Glu Phe Glu Ala Phe Leu Leu Gln Val Leu Asp Glu Asn Ala Val Thr
 340 345 350
 Ile Pro Glu Leu Gly Gln Val Arg Ala Gln Thr Pro Arg Ser Trp Cys
 355 360 365
 Ser Pro Arg Thr Ala Pro Ala Arg Cys Thr Thr Pro Ser Asn Ala Ala
 370 375 380
 Ala Cys Thr Thr Gly Ser Asn Thr Pro Thr Ser Arg Gly Lys Trp Arg
 385 390 395 400
 Ser Cys Ala Ala Ala Ser Arg Ala Ser Thr Asn Thr Ser Arg Arg Arg
 405 410 415
 Ser Pro Thr Pro Cys Arg Pro Cys Ala Gly Trp Thr Cys Ser Asn His
 420 425 430
 Pro Gly Ser Arg Ser Arg Trp Thr Gly His Glu Arg Cys Gly Asn Ser
 435 440 445
 Thr Ala Thr Cys Ser Thr Arg Arg Pro Arg Pro Arg Pro Ser Val Pro
 450 455 460
 Ser
 465

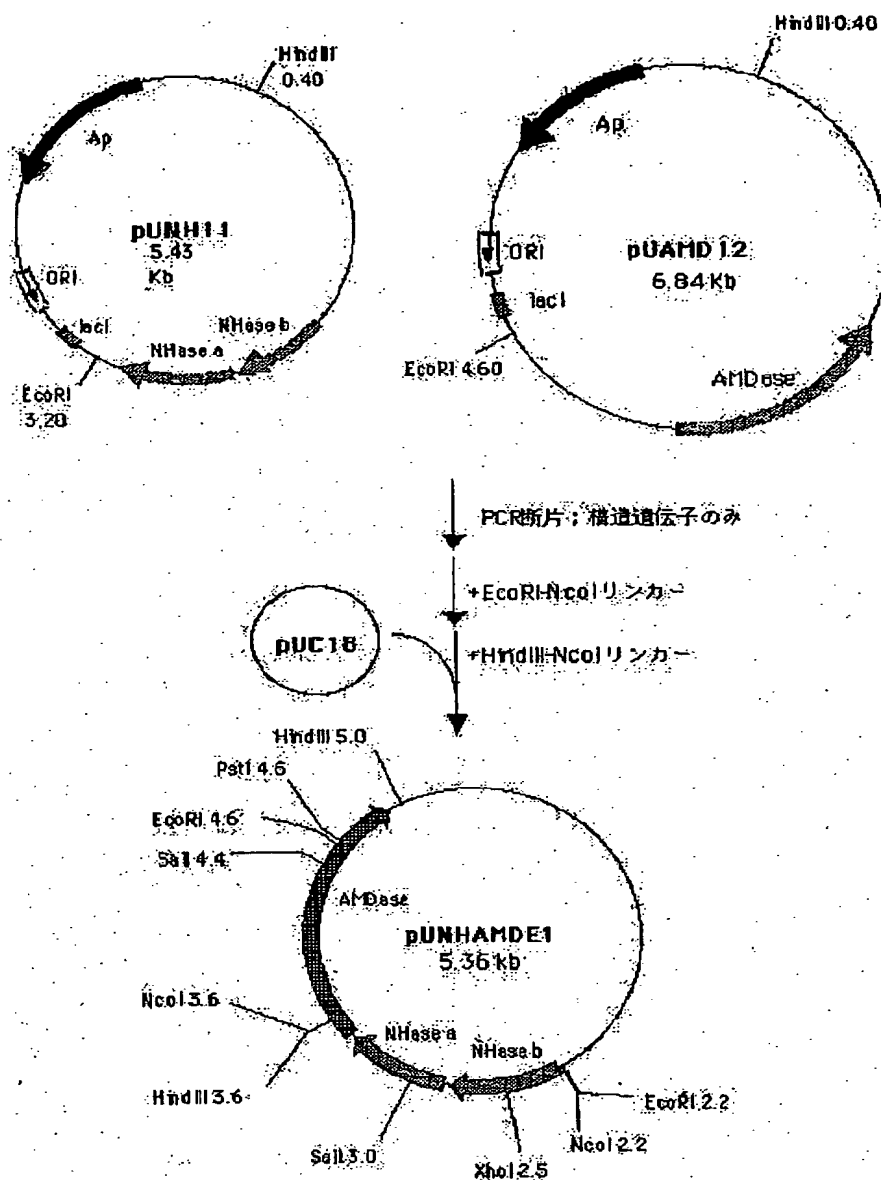
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テマート(参考)

C 1 2 N 9/80

C 1 2 P 13/00

9/88

13/02

C 1 2 P 13/00

C 1 2 R 1:01)

13/02

(C 1 2 N 9/80

//C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 R 1:01)

C 1 2 R 1:01)

(C 1 2 N 9/88

(C 1 2 N 9/80

C 1 2 R 1:01)

(20)

特開2001-292772

C 1 2 R 1:01)
(C 1 2 N 9/88
C 1 2 R 1:01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A
5/00 A
C 1 2 R 1:01)

Fターム(参考) 4B024 BA07 BA11 BA80 CA03 DA06
EA04 FA02 GA11 HA03 HA19
4B050 CC04 DD02 LL05
4B064 AE01 AE02 AG01 CA02 CA03
CA19 CC24 DA20
4B065 AA26X AA45Y AB01 AC14
BA02 CA27 CA31 CA60